

Rec'd PCT/PTO 14 MAR 2005

10/019543

PCT/JP 01/04158

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

14.06.01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年12月27日

REC'D 03 AUG 2001

WIPO PCT

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-396955

出 願 人
Applicant(s):

鐘淵化学工業株式会社

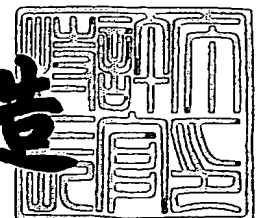
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 7月 6日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3063495

【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4353

【提出日】 平成12年12月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/63

C12N 15/81

C08L101/16

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区塩屋町 6 - 3 1 - 1 7 三青荘

【氏名】 横溝 聡

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県明石市朝霧町 3 - 1 2 3 セゾン朝霧 3 0 4

【氏名】 福地 健

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市大安寺東町 1 7 - 7

【氏名】 小坂田 史雄

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県西宮市大森町 1 1 - 3 3

【氏名】 松本 圭司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都府中市栄町 1 - 3 1 - 1 0

【氏名】 高木 正道

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県大宮市プラザ 5 7 - 2

【氏名】 太田 明德

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田 正利

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-148726

【出願日】 平成12年 5月19日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005027

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

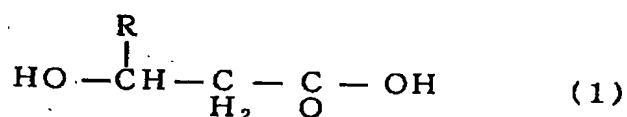
【発明の名称】 形質転換体およびそれを用いたポリエステルの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酵母に、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子からなる遺伝子発現カセットが一種以上導入されてなることを特徴とする形質転換体。

【請求項 2】 ポリエステルは、下記一般式 (1) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合体である請求項 1 記載の形質転換体。

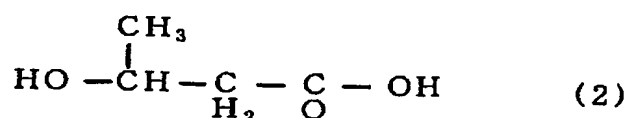
【化 1】



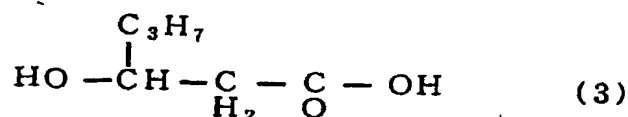
式中、R は、アルキル基を表す。

【請求項 3】 ポリエステルは、下記式 (2) で示される 3-ヒドロキシ酪酸と下記式 (3) で示される 3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステル P (3HB-co-3HH) である請求項 1 または 2 記載の形質転換体。

【化 2】



【化 3】



【請求項 4】 酵母がアシクロコニディウム属、アンブロシオザイマ属、アルスロアスカス属、アルキシオザイマ属、アシュビア属、バブジェビア属、ベンシングトニア属、ボトリオアスカス属、ボトリオザイマ属、ブレッタノマイセス属、ビュレラ属、ビュレロマイセス属、キャンディダ属、シテロマイセス属、クラビスポラ属、クリプトコッカス属、シストフィロバシディウム属、デバリオマ

イセス属, デッカラ属, ディポダスコプシス属, ディポダスカス属, エニエラ属, エンドマイコプセラ属, エレマスカス属, エレモセシウム属, エリスロバシディウム属, フェロマイセス属, フィロバシディウム属, ガラクトマイセス属, ゲオトリクム属, ガイラーモンデラ属, ハンセニアスポラ属, ハンセヌラ属, ハセガワエア属, ホルターマンニア属, ホルモアスカス属, ハイフォピキア属, イサットヘンキア属, クロエケラ属, クロエケラスポラ属, クルイベロマイセス属, コンドア属, クライシア属, クルツマノマイセス属, ロイコスポリディウム属, リポマイセス属, ロデロマイセス属, マラセジア属, メトシュニコウエア属, ムラキア属, マイクソザイマ属, ナドソニア属, ナカザワエア属, ネマトスポラ属, オガタエア属, オースポリディウム属, パチソレン属, ファチコスポラ属, ファフィア属, ピキア属, ロドスポリディウム属, ロドトルラ属, サッカロマイセス属, サッカロマイコーデス属, サッカロマイコプシス属, サイトエラ属, サカグチア属, サターノスポラ属, シゾブラストスポリオン属, シゾサッカロマイセス属, シュワニオマイセス属, スポリディオボラス属, スポロボロマイセス属, スポロパキデミア属, ステファノアスカス属, ステリグマトマイセス属, ステリグマトスポリディウム属, シンビオタフリナ属, シンポディオマイセス属, シンポディオマイコプシス属, トルラスポラ属, トリコスポリエラ属, トリコスポロン属, トリゴノプシス属, ツチヤエア属, ウデニオマイセス属, ワルトマイセス属, ウィカーハミア属, ウィカーハミエラ属, ウィリオプシス属, ヤマダザイマ属, ヤロウエア属, ザイゴアスカス属, ザイゴサッカロマイセス属, ザイゴウィリオプシス属又はザイゴザイマ属である請求項1～3のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項5】 酵母がヤロウエア・リポリティカである請求項1～4のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項6】 酵母がキャンディダ・マルトーサである請求項1～4記載のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項7】 ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現カセットが、酵母で機能するプロモーター、ターミネーターからなる請求項1～6のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項 8】 プロモーター、ターミネーターがヤロウィア・リポリティカ由来である請求項 7 項に記載の形質転換体。

【請求項 9】 プロモーターがヤロウィア・リポリティカの A L K 3 由来である請求項 7 又は 8 に記載の形質転換体。

【請求項 1 0】 ターミネーターがヤロウィア・リポリティカの X P R 2 由来である請求項 7 又は 8 に記載の形質転換体。

【請求項 1 1】 プロモーター、ターミネーターがキャンディダ・マルトーサ由来である請求項 7 項に記載の形質転換体。

【請求項 1 2】 プロモーターがキャンディダ・マルトーサの A L K 1 由来である請求項 7 又は 1 1 に記載の形質転換体。

【請求項 1 3】 ターミネーターがキャンディダ・マルトーサの A L K 1 由来である請求項 7 または 1 1 に記載の形質転換体。

【請求項 1 4】 ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエの P H A 合成酵素遺伝子、または、 P H A 合成酵素遺伝子および (R) 体特異的エノイル C o A ヒドラターゼ遺伝子である請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

【請求項 1 5】 請求項 1 から 1 4 記載のいずれか 1 項に記載の形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、前記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、共重合ポリエステルを酵素合成するために必要な遺伝子、同遺伝子を利用してポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、自然環境（土中、河川、海中）の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子を酵素合成する宿主内で機能する遺伝子、及び、同遺伝子を形質転換されたプラスチック様高分子を発酵合成する能力が改善された形質転換体、並びに、その形質転換体を利用した共重合ポリエステルの製造方法に関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例としては3-ヒドロキシ酪酸（以下3HBと略す）のホモポリマーであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下、P（3HB）と略す）であり、1925年にバシラス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*）で最初に発見された。P（3HB）は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしいグリーンプラスチックとして注目されてきた。しかし、P（3HB）は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲が限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

【 0 0 0 3 】

その中で、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報などに3-ヒドロキシ酪酸（3HB）と3-ヒドロキシ吉草酸（3HV）とからなる共重合体（以下P（3HB-co-3HV）と略す）の製造方法が開示されている。このP（3HB-co-3HV）はP（3HB）に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。しかしながら、実際のところP（3HB-co-3HV）は3HVモル分率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される柔軟性が向上しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取っ手など硬質成型体の分野にしか利用されなかった。

【 0 0 0 4 】

近年、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸（以下、3HHと略す）との2成分共重合ポリエステル（以下P（3HB-co-3HH）と略す）およびその製造方法について研究がなされた。たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP（3HB-co-3HH）の製造方法は、土壌より単離されたアエロモナス・キャビエ（*Aeromonas caviae*）を用いてオレイン酸等の脂肪酸やオリブオイル等の油脂から発酵生産するものであった。また、P（3HB-co-

3HH)の性質に関する研究もなされている(Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823 (1995))。この報告では炭素数が12個以上の脂肪酸を唯一の炭素源としてアエロモナス・キャピエを培養し、3HHが11~19mol%のP(3HB-co-3HH)を発酵生産している。このP(3HB-co-3HH)は3HHモル分率の増加にしたがって、P(3HB)の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P(3HB-co-3HV)を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。しかしながら、本製造方法では菌体生産量4g/L、ポリマー含量30%でありポリマー生産性が低いことから、実用化に向け更に高い生産性が得られる方法が探索された。

【0005】

P(3HB-co-3HH)を生産するアエロモナス・キャピエよりPHA(ポリヒドロキシアルカン酸)合成酵素遺伝子がクローニングされた(T. Fukui, Y. Doi, *J. Bacteriol.*, vol. 179, No. 15, 4821-4830 (1997)、特開平10-108682)。本遺伝子をラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*) (旧アルカリゲネス・ユートロファス(*Alcaligenes eutrophus*))に導入した形質転換株を用いてP(3HB-co-3HH)を生産を行った結果、菌体生産性は4g/L、ポリマー含量は30%であった。更に本形質転換株を炭素源として植物油脂を用いて培養した結果、菌体含量4g/L、ポリマー含量80%が達成された(T. Fukui等 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 333 (1998))。また、大腸菌等の細菌や植物を宿主としたP(3HB-co-3HH)の製造方法も開示されている(WO 00/43525)。しかし、本製造法による生産性は記載されていない。

【0006】

本ポリマーP(3HB-co-3HH)は3HHモル分率を変えることで、硬質ポリマーから軟質ポリマーまで幅広い物性を持つため、テレビの筐体などのように硬さを要求されるものから糸やフィルムなどのような柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できる。しかしながら、これらの製造方法で

は本ポリマーの生産性が依然として低く、本ポリマーの実用化に向けた生産方法としては未だ不十分といわざるを得ない。

【0007】

最近になって、3HBの前駆物質であるアセチルCoAを効率よく生産すると考えられる酵母を生産菌とした生分解性ポリエステルの生産研究がLeafらによって行われた(Microbiology, vol. 142, pp1169-1180(1996))。酵母の一種であるサッカロマイセス・セルビシエ(Saccharomyces cerevisiae)にラルストニア・ユートロファのポリエステル重合酵素遺伝子を導入して形質転換体を作製し、グルコースを炭素源として培養することによってP(3HB)の蓄積(ポリマー含量0.5%)を確認している。しかし、本研究で生産されるポリマーは硬くて脆い性質を有するP(3HB)であった。

【0008】

酵母は増殖が早く菌体生産性が高いことで知られている。酵母菌体は過去Single Cell Proteinとして注目され、ノルマルパラフィン炭素源とした飼料用菌体生産が研究されたり、調味料としてその核酸成分が利用されてきた。また、ポリマーの前駆物質であるacetyl-CoAを効率よく生産すると考えられることから高いポリマー生産性が期待される。さらに、細菌と比べて菌体と培養液との分離が容易であることから、ポリマーの抽出精製工程をより簡単にすることも可能である。そこで、優れた物性を有するP(3HB-co-3HH)を酵母を用いて生産する方法が求められていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記現状に鑑み、酵母で機能的かつ効率よく発現できるポリエステル合成に関与する遺伝子、及び、同遺伝子から成る遺伝子発現カセットを酵母に形質転換した形質転換体、並びに、得られた形質転換株を培養することにより、生分解性かつ優れた物性を有するP(3HB-co-3HH)等のポリエステルを酵母を宿主として製造する方法を提供するものである。

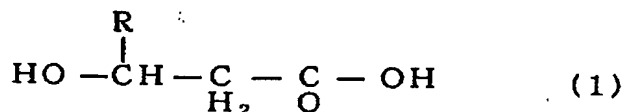
【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは様々な検討を行った結果、下記一般式（１）に示す３－ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子の一種以上のそれぞれに対して、酵母で実質的に遺伝子発現可能な新規遺伝子を作製し、同酵素遺伝子の一種以上のそれぞれに、酵母で実質的に機能するプロモーター、ターミネーターを連結することにより遺伝子発現カセットを作製し、さらに本遺伝子発現カセットを酵母に導入して形質転換株を作成し、本形質転換株を培養することにより、その培養物から下記一般式（１）に示す３－ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造することに成功した。

【 0 0 1 1 】

【化４】



式中、Rは、アルキル基を表す。

【 0 0 1 2 】

すなわち、本発明は、酵母に、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子からなる遺伝子発現カセットが一種以上導入されてなることを特徴とする形質転換体である。

本発明はまた、上記形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、上記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取するポリエステルの製造方法である。

ここで、「実質的」とはポリエステル合成に関与する遺伝子並びに遺伝子発現カセットの構築に必要なプロモーター、ターミネーター等の遺伝子配列は、遺伝子の機能並びに遺伝子発現に必要な機能を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じていてもよいものとする。

以下に、本発明の詳細を説明する。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

(1) 宿主

使用する酵母には特に制限はなく、菌株の寄託機関（例えばIFO、ATCC等）に寄託されているアシクロコニディウム属（*Aciculoconidium*属）、アンブロシオザイマ属（*Ambrosiozyma*属）、アルスロアスカス属（*Arthroascus*属）、アルキシオザイマ属（*Arxiozyma*属）、アシュビア属（*Ashbya*属）、バブジェビア属（*Babjevia*属）、ベンシングトニア属（*Bensingtonia*属）、ボトリオアスカス属（*Botryoascus*属）、ボトリオザイマ属（*Botryozyma*属）、ブレッタノマイセス属（*Brettanomyces*属）、ビュレラ属（*Bullera*属）、ビュレロマイセス属（*Bulleromyces*属）、キャンディダ属（*Candida*属）、シテロマイセス属（*Citeromyces*属）、クラビスポラ属（*Clavispora*属）、クリプトコッカス属（*Cryptococcus*属）、シストフィロバシディウム属（*Cystofilobasidium*属）、デバリオマイセス属（*Debaryomyces*属）、デッカラ属（*Dekkara*属）、ディポダスコプシス属（*Dipodascopsis*属）、ディポダスカス属（*Dipodascus*属）、エニエラ属（*Eeniella*属）、エンドマイコプセラ属（*Endomycopsella*属）、エレマスカス属（*Eremascus*属）、エレモセシウム属（*Eremothecium*属）、エリスロバシディウム属（*Erythrobasidium*属）、フェロマイセス属（*Fellomyces*属）、フィロバシディウム属（*Filobasidium*属）、ガラクトマイセス属（*Galactomyces*属）、ゲオトリクム属（*Geotrichum*属）、ガイラーモンデラ属（*Guilliermondella*属）、ハンセニアスポラ属（*Hanseniaspora*属）、ハンセヌラ属（*Hansenula*属）、ハセガワエア属（*Hasegawaea*属）、ホルターマンニア属（*Holtermannia*属）、ホルモアスカス属（*Hormoascus*属）、ハイフォピキア属（*Hyphopichia*属）、イサットヘンキア属（*Issatchenkia*属）、クロエケラ属（*Kloeckera*属）、クロエケラスポラ属（*Kloeckeraspora*属）

), クルイベロマイセス属 (Kluyveromyces属), コンドア属 (Kondoa属), クライシア属 (Kuraishia属), クルツマノマイセス属 (Kurtzmanomyces属), ロイコスポリディウム属 (Leucosporidium属), リポマイセス属 (Lipomyces属), ロデロマイセス属 (Lodderomyces属), マラセジア属 (Malassezia属), メトシュニコウィア属 (Metschnikowia属), ムラキア属 (Mrakia属), マイクソザイマ属 (Myxozyma属), ナドソニア属 (Nadsonia属), ナカザワエ属 (Nakazawaea属), ネマトスポラ属 (Nematospora属), オガタエ属 (Ogataea属), オースポリディウム属 (Oosporidium属), パチソレン属 (Pachysolen属), ファチコスポラ属 (Phachytichospora属), ファフィア属 (Phaffia属), ピキア属 (Pichia属), ロドスポリディウム属 (Rhodosporidium属), ロドトルラ属 (Rhodotorula属), サッカロマイセス属 (Saccharomyces属), サッカロマイコーデス属 (Saccharomyces属), サッカロマイコプシス属 (Saccharomycopsis属), サイトエラ属 (Saitoella属), サカグチア属 (Sakaguchia属), サターノスポラ属 (Saturnospora属), シゾブラストスポリオン属 (Schizoblastosporion属), シゾサッカロマイセス属 (Schizosaccharomyces属), シュワニオマイセス属 (Schwanniomyces属), スポリディオボラス属 (Sporidiobolus属), スポロボロマイセス属 (Sporobolomyces属), スポロパキデミア属 (Sporopachydermia属), ステファノアスカス属 (Stephanoascus属), ステリグマトマイセス属 (Sterigmatomyces属), ステリグマトスポリディウム属 (Sterigmatosporidium属), シンビオタフリナ属 (Symbiotaphrina属), シンポディオマイセス属 (Sympodiomyces属), シンポディオマイコプシス属 (Sympodiomycopsis属), トルラスポラ属 (Torulaspora属), トリコ

スポリエラ属 (*Trichosporiella*属), トリコスポロン属 (*Trichosporon*属), トリゴノプシス属 (*Trigonopsis*属), ツチヤエア属 (*Tsuchiyaea*属), ウデニオマイセス属 (*Udeniomyces*属), ワルトマイセス属 (*Waltomyces*属), ウィカーハミア属 (*Wickerhamia*属), ウィカーハミエラ属 (*Wickerhamiella*属), ウィリオプシス属 (*Williopsis*属), ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*属), ヤロウィア属 (*Yarrowia*属), ザイゴアスカス属 (*Zygoascus*属), ザイゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces*属), ザイゴウィリオプシス属 (*Zygowilliopsis*属) 又は ザイゴザイマ属 (*Zygozyma*属) などの酵母を使用することができる。

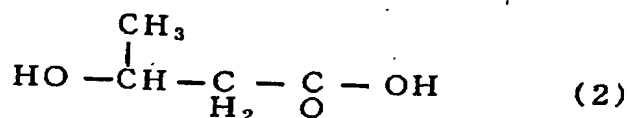
また、本発明の形質転換体において用いられる酵母として、キャンディダ・マルトーサ (*Candida malosa*)、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) が好ましいが、特にキャンディダ・マルトーサが好ましい。

(2) ポリエステル合成に関与する酵素並びに遺伝子

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子としては特に限定されないが、上記一般式 (1) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子が好ましく、下記式 (2) で示される 3-ヒドロキシ酪酸と下記式 (3) で示される 3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステル P (3HB-co-3HH) の合成に関与する酵素遺伝子であることがより好ましい。

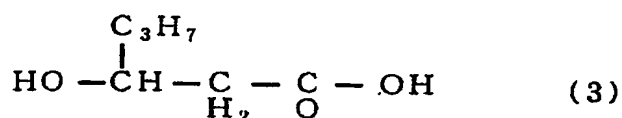
【0014】

【化5】



【0015】

【化6】



上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子としては特に限定されず、例えば特開平10-108682号公報に記載されているポリエステル合成酵素遺伝子を用いることができる。上記ポリエステル合成酵素遺伝子としては、例えば、PHA合成酵素遺伝子があげられる。また、本ポリエステル合成酵素遺伝子と共にポリエステル合成に関与する酵素遺伝子を用いても良い。これらの酵素遺伝子としては、たとえば、β酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))や、アセチルCoAを二量化してモノマーである3-ヒドロキシブチリルCoAを合成するβケトチオラーゼ遺伝子・NADPH依存性アセトアセチルCoA還元酵素遺伝子(Peoples OP, et al J. Biol. Chem. 264 (26) 15298-15303 (1989))などが挙げられる。

【0016】

前記宿主酵母の中には遺伝暗号読みとり異常を示す場合がある。例えばキャンディダ・シリンドラセア(Candida cylindracea)(Y. Kawaguchi et al, Nature 341 164-166 (1989))やキャンディダ・マルトーサ(H. Sugiyama et al, Yeast 11 43-52 (1995))では遺伝暗号CTGが、ロイシンではなくセリンに翻訳される特殊な酵母である。このような酵母では、ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子を発現させる場合、遺伝暗号の読みとり異常が生じることから、当該酵素のアミノ酸配列の異なった酵素が生産されることがある。その結果、当該酵素の機能が十分発揮できない。

このような現象は、予め遺伝子内に含まれる遺伝暗号CTGをロイシンに対応す

る他の遺伝暗号 (TTA, TTG, CTT, CTC, CTA) に変換した遺伝子を使用することによって避けることができる。

【 0 0 1 7 】

また、酵母を含む生物の遺伝暗号解析の結果、遺伝暗号の使用頻度は生物によって大きく異なることが明らかになっている。すなわち、複数ある同一アミノ酸を指定する遺伝暗号のうち使用される遺伝暗号は生物によって偏りが認められ、使用頻度の高い遺伝暗号から成る遺伝子の翻訳効率が高いことが指摘されている。例えばアエロモナス・キャビエの PHA 重合酵素遺伝子や (R) 体特異的エノイル CoA ヒドラーゼ遺伝子の GC 含量はそれぞれ 67.16%、65.77% であるが、キャンディダ・マルトーサで現在までに報告されている酵素、例えばホスホグリセリン酸キナーゼでは 39.55% また ALK2-A では 35.67% である。したがって、例えばポリエステル合成に関与する遺伝子をキャンディダ・マルトーサにおいて効率よく発現させるためには、前記の遺伝暗号 CTG を他のロイシン対応遺伝暗号に変化することに加えて、キャンディダ・マルトーサにおいて使用頻度の高い遺伝暗号に変更した当該遺伝子を使用することが好ましい。

【 0 0 1 8 】

本ポリエステル合成に関与する酵素の遺伝子は、遺伝暗号に読みとり異常を示さない酵母では、前記酵素遺伝子をそのまま利用しても良いし、アミノ酸配列を変更することなく当該酵母において使用頻度の高い遺伝暗号に変換した遺伝子を利用しても良い。また、遺伝暗号に読みとり異常を示す酵母では、前記酵素遺伝子の CTG コドン を TTA, TTG, CTT, CTC または CTA に変換した遺伝子を利用しても良い。さらに、アミノ酸配列を変更することなく当該酵母において使用頻度の高い遺伝暗号に変換した遺伝子を利用しても良い。一例として、キャンディダ・マルトーサを宿主とした場合、本ポリエステル合成に関与する遺伝子として配列番号 1、配列番号 2 に示される遺伝子を利用することができる。

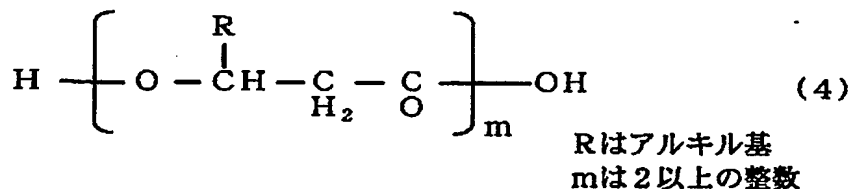
これらの遺伝子は実質的な酵素活性を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じていてもよいものとする。

【0019】

また、上記PHA合成酵素によって合成されるポリエステルは、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるものであり、下記一般式(4)に示される。より好ましい態様においては、上記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)であり、下記一般式(5)に示される。

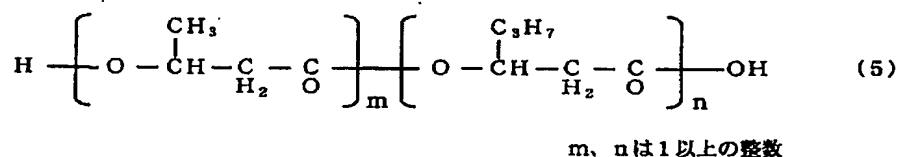
【0020】

【化7】



【0021】

【化8】



(3) 遺伝子発現カセットの構築

酵母における遺伝子発現のためには、当該遺伝子の5'上流にプロモーター、UAS等のDNA配列の連結、当該遺伝子の3'下流にポリA付加シグナル、ターミネーター等のDNA配列の連結が必要である。これらのDNA配列は酵母で機能する配列であればどのような配列でも利用できる。プロモーターには構成的に発現を行うものや誘導的に発現を行うものがあるが、いずれのプロモーターも用いてもよい。

【0022】

また、本発明の形質転換体においては、上記プロモーター、ターミネーターは、ポリエステルの生産に使用する生物において機能するものであるものが好まし

い。たとえば、キャンディダ・マルトースを使用する場合は、キャンディダ・マルトースで機能するものであることが好ましく、上記プロモーター、ターミネーターがキャンディダ・マルトース由来であることが好ましい。より好ましくは、キャンディダ・マルトースの A L K 1 由来のプロモーター、A L K 1 由来のターミネーターを利用する。また、ヤロウィア・リポリティカを使用する場合は、上記プロモーター、ターミネーターは、ヤロウィア・リポリティカ由来であることが好ましい。

【 0 0 2 3 】

本発明の形質転換体に用いられる遺伝子発現カセットは一例として、次のように構築することができる。

構築に用いられるベクターは、大腸菌において自立増殖するプラスミドであればどのようなベクターでもよく、更に酵母において自立増殖可能な領域を合わせ持っていてよい。酵母において自立増殖できるベクターでは、菌体内に保持される。また、遺伝子発現カセットを染色体上に組み込むこともできる。一例としてキャンディダ・マルトースにおいて自立増殖可能な p U T U 1 を用いることができる (M. Ohkuma, et al J. Biol. Chem., vol. 273, 3948-3953 (1998))。

【 0 0 2 4 】

本発明の形質転換体においては、ポリエステルの合成に関与する遺伝子がアエロモナス・キャビエ由来の酵素と同じアミノ酸配列をコードする遺伝子であることが好ましく、例えば、アエロモナス・キャビエの由来の P H A 重合酵素アミノ酸配列と同じアミノ酸配列をキャンディダ・マルトースにおいてコードする遺伝子 (以下 O R F 2 と略す) 配列番号 1、または、O R F 2 及び β 酸化経路の中間体のエノイル C o A をモノマーである (R) - 3 - ヒドロキシアシル C o A に変換する (R) 体特異的エノイル C o A ヒドラターゼと同じアミノ酸配列をキャンディダ・マルトースにおいてコードする遺伝子 (以下 O R F 3 と略す) 配列番号 2 が好適に用いられる。(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))

)

これらの構造遺伝子のそれぞれ5' 上流にキャンディダ・マルトーサのAlk1 遺伝子のプロモーターALK1p (配列番号3)、ターミネーターALK1t (配列番号4) (GenBank D00481) (M. Takagi, et al Agric. Biol. Chem., vol. 5, 2217-2226 (1989)) を連結することができる。

プロモーターおよびターミネーターと構造遺伝子を連結するための制限酵素部位を作成するためには、PCR法が利用できる。PCRに用いるプライマー配列は配列番号5から配列番号8に示す。PCRの条件は目的遺伝子断片が増幅できればどのような条件を用いてもよい。

【0025】

プロモーター部分は配列番号3を鋳型にして配列番号5と配列番号6を用いて、5' 末端がSalI、3' 末端がNdeIのALK1pを作製することができる。ターミネーター部分は配列番号4を鋳型にして配列番号7と配列番号8を用いて、5' 末端がHindIII、3' 末端がEcoRVのALK1tを作製することができる。ベクターにはpUTU1とキャンディダ・マルトーサのAde1 遺伝子 (配列番号9、GenBank D00855) (S. Kawai, et al, Agric. Biol. Chem., vol. 55, 59-65 (1991)) を用いて、マーカー遺伝子をウラシルからアデニンに変更したベクターpUTA1 (図1) を使用することができる。pUCNT (WO94/03613に記載) のPvuII、NdeIサイトにALK1tを結合し、またpUCNTのHindIII、SspIサイトにALK1tを結合してpUAL1 (図2) を構築することができる。次にpUAL1のNdeI、PstIサイトにORF2を結合し、プラスミドpUAL-ORF2 (図3) を構築することができる。また、pUAL1を構築する途中に構築するpUCNT-ALK1tのNdeI、HindIIIサイトにORF3を結合し、さらにALK1pを結合することで、pUAL-ORF3 (図4) を構築することができる。

【0026】

つぎに、プラスミドpUAL-ORF2からEcoT22Iを用いて、ORF2とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出

し、pUTA1のPstIサイトに結合し、pUTA-ORF2を構築することができる。さらに、pUAL-ORF3からSalIを用いてORF3とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出し、pUTA-ORF2のSalIサイトに結合したプラスミドpUTA-ORF23（図5）を構築することができる。以上の方法により、酵母キャンディダ・マルトーサにおいて上記一般式（1）で示されるアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築することができる。

（4）形質転換体の作製

酵母にポリマー合成に関与する遺伝子発現カセット組換えベクターを導入するためには、公知の方法により行うことができる。例えば、カルシウム法（Lederberg, E. M. et al., J. Bacteriol. 119. 1072 (1974)）やエレクトロポレーション法（Current Protocols in Molecular Biology, 1巻、1. 8. 4頁、1994年）等を用いることができる。また、Fast TrackTM-Yeast Transformation Kit_{SM}（Geno Technology）のような市販の形質転換キットを利用することもできる。

【0027】

一例として宿主として、キャンディダ・マルトーサ CHA1株（S. Kawai, et al, Agric. Biol. Chem., vol. 55, 59-65 (1991)）を用いることができる。本菌株に上記の形質転換法を用いてポリマー合成に関与する遺伝子発現カセットを形質転換し、pUTA-ORF23を有するキャンディダ・マルトーサ PHA1株を作製することができる。

（5）ポリエステルの製造

本発明のポリエステルの製造方法では、本発明の形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取する。

本発明の形質転換体を培養することによるポリエステルの製造は、次のようにして行うことができる。培養に用いる炭素源としては、酵母が資化できるものであればどのようなものでもよい。また、プロモーターの発現が誘導型である場合に

は、適時誘導物質を添加すればよい。誘導物質が主要炭素源である場合もある。炭素源以外の栄養源としては窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の生育可能な温度であればよいが、20℃から40℃が好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた該培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すればよい。

【0028】

炭素源としてはグルコース、グリセリン、シュクロース等の炭水化物や油脂類や脂肪酸類さらには n -パラフィン等を用いることができる。油脂としては、例えばナタネ油、ヤシ油、パーム油、パーム核油などが挙げられる。脂肪酸としてはヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和・不飽和脂肪酸、あるいはこれら脂肪酸のエステルや塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。一例としてキャンディダ・マルトーサの培養において、炭素源として油脂を用いて培養することもできる。また、油脂を資化ができないかまたは効率よく資化できない酵母では、培地中にリパーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リパーゼ遺伝子を形質転換することにより、油脂資化能を付与することもできる。また、炭素源として奇数の炭素鎖を有する脂肪酸や n -パラフィン等を用いた場合、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの炭素鎖に奇数成分の割合を高めることができる。

【0029】

窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

【0030】

その他の有機栄養源としてはアミノ酸類、例えばグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなどや、ビタミン類、例えばビタミンB1、ビタミンB12、ピオチン、ニコチン酸アミド、パントテン酸、ビタミンC等が挙げられる。

【 0 0 3 1 】

本発明において、ポリエステルの菌体からの回収は例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器などで菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体をクロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液を濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。沈殿したポリエステルを濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収することができる。得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行う。

【 0 0 3 2 】

本発明のポリエステルの製造方法は、上述のような構成からなるので、上記一般式（１）で示される３-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを生産性良く製造することができる。

また、上述したプラスミド pUTA-ORF23 を有するキャンディダ・マルト-サ組み換え株を作製し、培養する方法により、上記一般式（２）で示される３-ヒドロキシ酪酸と上記一般式（３）で示される３-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステル P（3HB-co-3HH）を製造することができる。

【 0 0 3 3 】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

【 0 0 3 4 】

（実施例１）ポリエステル合成に関与する遺伝子の合成

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子として、アエロモナス・キャピエの由来の PHA 合成酵素と、 β 酸化経路の中間体のエノイル CoA をモノマーである（R）-３-ヒドロキシアシル CoA に変換する（R）体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ（T. Fukui, et al FEMS Microbiolog

y Letters, vol. 170, 69-75 (1999)) のアミノ酸配列をもとに、当該酵素遺伝子を合成した。

キャンディダ・マルトーサはCTGコドンでロイシンではなくセリンに翻訳する酵母である。このため、ロイシンコドンにはCTGを割り当てなかった。各アミノ酸に対応するコドンはキャンディダ・マルトーサにおいて使用頻度の高いコドンを優先的に選択した。コドンの使用頻度はKlaus Wolf著のNonconventional Yeast in Biotechnology (Springer出版) を参考にした。このようにしてPHA合成酵素遺伝子(ORF2; 配列番号1)と(R)体特異的エノイルCoAヒドラーゼ遺伝子(ORF3; 配列番号2)を設計し、これらの配列を元にORF2とORF3を全合成した。

【0035】

(実施例2) 組換えプラスミドおよび組換え株の構築

前記ORF2、ORF3がキャンディダ・マルトーサで発現するように、それぞれの5'上流にキャンディダ・マルトーサのAlk1遺伝子のプロモーターALK1p(配列番号3、GenBank D00481)を、3'下流にキャンディダ・マルトーサのAlk1遺伝子のターミネーターALK1t(配列番号4)を連結することにした。プロモーターおよびターミネーターと構造遺伝子を連結するための制限酵素部位を作成するためには、PCR法を利用した。PCRに用いたプライマー配列を配列番号5から配列番号8に示す。PCRの条件は94℃ 1分、55℃ 2分、72℃ 3分を1サイクルとし、これを25回繰り返して、目的遺伝子断片を増幅した。ポリメラーゼは宝酒造(株)のExTaqを使用した。プロモーター部分は配列番号3を鋳型にして配列番号5と配列番号6を用いて、5'末端がSalI、3'末端がNdeIのALK1pを作製した。ターミネーター部分は配列番号4を鋳型にして配列番号7と配列番号8を用いて、5'末端がHindIII、3'末端がEcoRVのALK1tを作製した。最終的にORF2とORF3を連結するベクターにはpUC19にキャンディダ・マルトーサの自己複製領域(ARS)(GenBank D29758)およびURA3遺伝子(GenBank D12720)を連結したpUTU(M. O

hkuma, et al, J. Biol. Chem., vol. 273, 3948-3953 (1998))とキャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子(配列番号9、Genebank D00855)を用いて、マーカー遺伝子をウラシルからアデニンに変更したベクターであるpUTA1(図1)を使用した。pUTA1は、pUTU1からXhoIを用いてURA3遺伝子を除去し、これにSalIを用いて切り出したADE1遺伝子断片を接続し構築した。

【0036】

pUCNT(WO94/03613に記載)のPvuII、NdeIサイトにALK1tを結合し、またpUCNTのHindIII、SspIサイトにALK1tを結合してpUAL1(図2)を構築した。次にpUAL1のNdeI、PstIサイトにORF2を結合し、プラスミドpUAL-ORF2(図3)を構築した。また、pUAL1を構築する途中に構築するpUCNT-ALK1tのNdeI、HindIIIサイトにORF3を結合し、さらにALK1pを結合することで、pUAL-ORF3(図4)を構築した。

【0037】

つぎに、プラスミドpUAL-ORF2からEcoT22Iを用いて、ORF2とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出し、pUTA1のPstIサイトに結合し、pUTA-ORF2を構築した。さらに、pUAL-ORF3からSalIを用いてORF3とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出し、pUTA-ORF2のSalIサイトに結合したプラスミドpUTA-ORF23(図5)を構築した。以上の方法により、酵母キャンディダ・マルトーサにおいて上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築した。全体の構築図を図6に示した。

【0038】

宿主にはキャンディダ・マルトーサ CHA1株(S. Kawai, et al, Agric. Biol. Chem., vol. 55, 59-65 (1991))を使用した。宿主に構築したプラスミドを導入するために、Fast TrackTM-Yeast Transformation KitSM(Geno

Technology) を使用した。プロトコルにしたがって操作し、選択プレート (0.67w/v% Yeast Nitrogen base without amino acid、2w/v% グルコース、24mg/L ヒスチジン、2w/v% 寒天) を使用して組換え株を取得した。

【0039】

(実施例3)

プラスミド pUTA1, pUTA-ORF23 株を有するキャンディダ・マルトーサ組換え株を次のように培養した。前培地は YNB 培地 (0.67w/v% Yeast Nitrogen base without amino acid) に 1w/v% カザミノ酸、2w/v% パーム油添加した培地を使用した。ポリエステル生産培地は YNB 培地に 1w/v% カザミノ酸を添加し、炭素源として ① 2w/v% パーム油、② 2w/v% ヤシ油、③ 2w/v% テトラデカン、④ 2w/v% ヘキサデカンを添加した培地を使用した。

【0040】

各組換え株のグリセロールストック 100 μ l を 50ml の前培地が入った 500ml 坂口フラスコに接種して 20 時間培養し、500mL の生産培地を入れた 2L 坂口フラスコに 10v/v% 接種した。これを培養温度 30℃、振盪速度 120rpm、培養時間は 72 時間という条件で培養した。培養液をオートクレーブ後、遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄した後、凍結乾燥して乾燥菌体重量を測定した。

得られた乾燥菌体を粉砕し、クロロホルムを 100ml 添加し一晚攪拌して抽出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで 1-2ml にまで濃縮し、濃縮液に 10ml のヘキサンを添加して、ヘキサン不溶物を析出させた。

【0041】

その結果、プラスミド pUTA-ORF23 を導入した組換え株をヤシ油、テトラデカン、ヘキサデカンで培養したものに白色沈殿が見られた (表1)。ヤシ油で培養したときに得られたヘキサン不溶物の NMR 分析 (JEOL、JNM-EX400) の結果を表1、図7に示す。

【0042】

【表 1】

表1 組換え株培養結果	炭素源	菌体量(g/L)	ポリマーの蓄積
	パーム油	12.5	-
	ヤシ油	10.3	++
	テトラデカン	4.4	+++
	ヘキサデカン	3.6	+++

この結果から、酵母キャンディダ・マルトーサを用いて共重合ポリエステル P (3HB-co-3HH) が生産できることがわかった。

【0043】

【発明の効果】

本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルを、酵母を用いて生産することが可能となった。

【0044】

【配列表】

<110>鐘淵化学工業株式会社 KANEKA CORPORATION

<120>ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子

<130>TKS-4353

<160>9

<210> 1

<211> 1785

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> 1..1785

<400> 1

atg tct caa cca tct tat ggt cca ttg ttc gaa gct ttg gct cat tac 48
aat gat aaa ttg ttg gct atg gct aaa gct caa acc gaa aga act gct 96
caa gcc ttg ttg caa act aac ttg gat gat ttg ggt caa gtt ttg gaa 144
caa ggt tct caa caa cca tgg caa ttg att caa gct caa atg aat tgg 192
tgg caa gat caa tta aaa ttg atg caa cac act ttg tta aaa tct gct 240
ggt caa cca tct gaa cca gtt att act cca gaa aga tct gat aga aga 288
ttt aaa gct gaa gct tgg tct gaa caa cca att tat gat tac tta aaa 336
caa tcc tat ttg tta act gct aga cat ttg ttg gct tct gtt gat gct 384
ttg gaa ggt gtc cca caa aaa tct aga gaa aga ttg aga ttc ttt act 432
aga caa tac gtc aac gct atg gct cca tct aat ttc ttg gct act aac 480
cca gaa ttg tta aaa ttg act ttg gaa tcc gat ggt caa aat ttg gtt 528
aga ggt ttg gct tta ttg gct gaa gat ttg gaa aga tct gct gat caa 576
tta aac att aga ttg act gat gaa tcc gct ttt gaa tta ggt aga gat 624
ttg gct ttg act cca ggt aga gtt gtt caa aga act gaa tta tat gaa 672
tta att caa tac tct cca act act gaa acc gtt ggt aaa acc cca gtt 720
ttg atc gtt cca cca ttc att aat aaa tat tac att atg gat atg aga 768
cca caa aac tcc ttg gtc gct tgg ttg gtc gct caa ggt caa acc gtt 816
ttc atg att tcc tgg aga aac cca ggt gtt gct caa gct caa att gat 864
tta gat gat tat gtt gtt gat ggt gtc att gct gct ttg gat ggt gtt 912

gaa gcc gct act ggt gaa aga gaa gtt cac ggt att ggt tac tgt att 960
ggt ggt acc gct ttg tct tta gct atg ggt tgg ttg gcc gcc aga aga 1008
caa aaa caa aga gtt aga act gct act ttg ttt act act ttg ttg gat 1056
ttc tcc caa cca ggt gaa ttg ggt att ttt att cat gaa cca att atc 1104
gcc gcc tta gaa gcc caa aat gaa gct aaa ggt att atg gat ggt aga 1152
caa ttg gcc gtc tcc ttc tct ttg ttg aga gaa aac tct tta tat tgg 1200
aat tac tat att gat tct tac tta aaa ggt caa tct cca gtt gct ttt 1248
gat ttg ttg cac tgg aac tct gat tct act aat gtt gcc ggt aaa act 1296
cat aac tct ttg ttg aga aga tta tat ttg gaa aat caa ttg gtt aaa 1344
ggt gaa tta aaa att aga aac act aga att gat tta ggt aaa gtt aaa 1392
act cca gtt ttg ttg gtt tct gcc gtt gat gat cac att gct tta tgg 1440
caa ggt acc tgg caa ggt atg aaa ttg ttc ggt ggt gaa caa aga ttt 1488
tta ttg gcc gaa tcc ggt cat att gct ggt att att aat cca cca gct 1536
gct aac aaa tac ggt ttc tgg cac aat ggt gct gaa gct gaa tct cca 1584
gaa tct tgg ttg gct ggt gcc acc cat caa ggt ggt tcc tgg tgg cca 1632
gaa atg atg ggt ttt att caa aac aga gat gaa ggt tct gaa cca gtc 1680
cca gcc aga gtc cca gaa gaa ggt ttg gct cca gct cca ggt cac tat 1728
gtc aaa gtt aga tta aac cca gtt ttc gct tgt cca acc gaa gaa gat 1776
gct gct taa 1785

<210>2

<211>405

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>CDS

<222>1..405

<400>2

atg tct gct caa tcc ttg gaa gtt ggt caa aaa gct aga tta tct aaa 48
 aga ttc ggt gcc gcc gaa gtt gct gct ttt gct gcc tta tct gaa gat 96
 ttc aac cca ttg cac ttg gat cca gct ttt gct gct act acc gcc ttc 144
 gaa aga cca atc gtc cat ggt atg ttg tta gct tct tta ttt tcc ggt 192
 ttg ttg ggt caa caa ttg cca ggt aaa ggt tct att tat ttg ggt caa 240
 tct tta tct ttc aaa ttg cca gtc ttt gtc ggt gat gaa gtt acc gct 288
 gaa gtt gaa gtt act gct ttg aga gaa gat aaa cca att gct act ttg 336
 act act aga att ttc act caa ggt ggt gct tta gct gtt acc ggt gaa 384
 gct gtt gtc aaa ttg cca taa 405

<210>3

<211>1017

<212>DNA

<213>Candida maltosa

<220>

<223>promoter ALK1p

<400>3

atgcatgaac aggatttaac cccaagaaaa aagtctatit tctattttca caaggaaact 60
 ggaaaaacct ttttgtgttt tgaagtagct ccgtaataac ctgtaaaaaa ataaattttg 120
 aagatttgac ttgctgatga aaatgctatc agtgtagctc tagacttgat actagactat 180
 gatggcaaca catggtggtc aacgtgcaag acatcaccca atgagaagac tgctaaccag 240
 aaaaaaaagg ggacaaaaga aaaactcgag agaaaaagtc aaattggtgt aaaattggct 300
 atttttggta ctttcctaatt ggggaaatta attgtttaaa attccagttt ttccagagtt 360
 aagatttcga ccaattattt ttaatccata tgatcttcat cattatcaac ttgtgaaaaa 420
 taataatcga ggtacgttta atacgagata ttagtctacg gctatgaatg ttggatatac 480
 ttcattgacg atcagaagct tgattggtta ttcaggtgca tgtgtggata taaacccaac 540

aaattatcta gcaactgtgc cttccccaca ttggtcaaag aaaccctaaa gcaaattaaa 600
 atctggataa ataaatcatt catttcacat tttccggtta gtataagggt ttttaaattt 660
 ttttttacag tttagccctt tcaattacca aatacggtaa caatgtgctt tgtaacatgc 720
 aggggatttt ctccgttgct gttttctcca catgctttta atgtgtaata aattaaaaaa 780
 attacaaaga aaaaccggca tataagcadc ggagtttaca ttgttaacta actgcaaaaat 840
 ggcgatgttt caaatcaaca aaatttaaaa aaaccccaaa aaaaaagtat catataaatt 900
 aaactcaaaa tccttttgat tgcataaaat ttttaaattt cttctttttt ttctttttta 960
 ctttcttadc tattctattc tttttttata tatctaattc attataaca tctgggc 1017

<210>4

<211>218

<212>DNA

<213>Candida maltosa

<220>

<223>terminater ALK1t

<400>4

atagatggat tttctttttt tatgtgtatt tccggttaat aaatgtttta attttttttt 60
 taataaaaaat attttaggtt atttatatgc aaaaaaaaaa aatattcaaa gcaatcttcc 120
 tttctttctt tatctttccc ccatgctaag gtctaaaaca ccacaactta aaacccaact 180
 taaccgtata atactaagat caatctccaa agatgcat 218

<210>5

<211>46

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>primer

<400>5

tttttcagct ggagctcgtc gacatgcatg aacaggattt aatccc

46

<210>6

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>primer

<400>6

ccggaattcc atatgcagat gttataaatg aattagata

39

<210>7

<211>32

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>primer

<400>7

cggaagctta tagatggatt tttctttttt at

32

<210>8

<211>45

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>primer

<400>8

ttttgatatc gagctcgtcg acatgcatct ttggagattg atctt

45

<210>9

<211>1820

<212>DNA

<213>Candida maltosa

<220>

<221>CDS

<222>538..1413

<223>Ade1

<400>9

gatcccttc ttcaaaccct taaatgacat tgtttcgttt ctctatgttt ggtatcggtt 60
 cttcttcttc ttcaaaaaaa aggggggcac tattcaaaaa aaaatattat aacagtatga 120
 tttttttccc tctcccgtcg attgagggtt tttttttctc ttctgtcttg gtcttttgct 180
 tttcaactcca aaaatggaaa cacgcgcggc tcaactcgaa atccgtgatc aaaaaataa 240
 aggctgtgag ttctgagcca ataattatga attagtggta ttttttttaa agataaataa 300
 tcaagaatcg cattagggag acgaatatgc gttattcaaa taaaagaca attcttttag 360
 ggtagcatth cccttcaagt tcatcccaca tgtacattaa tgtcaatgat gtcgcagaag 420
 ttaaattagc agaagaaaaa aaaaatgtga attactccga gtcaactctt ctttctcttc 480
 ttctttttct tctttatcac cataatcacc accaccacca ccaccaccag ctcccagatg 540

acttcaacta acttagaagg aactttccca ttgattgcc aaggttaaagt cagagatatt 600
 taccaagttg acgacaacac tcttttattc gttgctactg atagaatttc cgcatacgat 660
 gtgattatgt ctaatggtat cccaaataaa ggtaaaatct taaccaaatt gtctgaattc 720
 tggtttgatt tcttgccaat tgaaaacat ttaatcaaag gagacatttt ccaaaaatat 780
 cctcaactag aaccatatag aaaccaattg gaaggcagat ccttacttgt tagaaaattg 840
 aaattgatcc ctcttgaagt tattgttaga ggttacatca ccggttccgg ctggaaagaa 900
 taccaaaaat ctaaaaccgt ccacggtatt cctattggtg atgtggttga atcacaacaa 960
 atcactccta tcttcacccc atccactaaa gcagaacaag gtgaacatga tgaaaatatc 1020
 accaaagaac aagctgacaa gattgttggg aaagaattat gtgatagaat tgaaaaaatt 1080
 gctattgatt tgtacaccaa agccagagat tacgctgcc aataagggaat tattatcgct 1140
 gatactaaat ttgaatttgg tttagatggt gacaacatcg ttcttgttga cgaagtttta 1200
 actccagatt ctccagatt ctggaatgct gctaaatacg aagtttgtaa atctcaagac 1260
 tcttacgata aacaattttt gagagattgg ttaacttcta atggtgttgc tggtaaagat 1320
 ggtgttgcta tgcctgaaga cattgtcact gaaaccaaga gcaaatacgt tgaagcttac 1380
 gaaaatttaa ctggtgacaa atggcaagaa taaattaagg atatctatta ttaaagcttt 1440
 ctatttatcc caaactttcg tagtattttc tgacatgttc agatgttttt actttatctt 1500
 tcttgaaatt ttgatttct aaccgactct tgcatgtagc tcttgataat gcaacatatg 1560
 cttgaccatt agcaaaactt ctacctaaat ctattttgac tctgtccaaa gtttgacctt 1620
 gagctttgtg gatcgacatc gccacgaca agatcatttg gtttgttttt atggtgggtt 1680
 attggcactt ggtgcaactg atggtttaac tttggaagag gctaagaaat tgaagacttg 1740
 gaatgaagaa cgtgcatctg atttcaaatt ggggaagaa ttgacttata cttgttataa 1800
 aatgtatcat gatgttgatc 1820

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例においてベクターとして使用したプラスミド p U A 1 を示す模式図である。

【図 2】 実施例において構築したプラスミド p U A L 1 を示す模式図である。

【図 3】 実施例において構築したプラスミド p U A L - O R F 2 を示す模式図である。

【図 4】 実施例において構築したプラスミド p U A L - O R F 3 を示す模式図である。

【図 5】 実施例において構築したプラスミド p U T A - O R F 2 3 を示す模式図である。

【図 6】 本発明の形質転換体を作成する際に用いられるプラスミドの構築方法を示したプラスミド構築図である。

【図 7】 実施例において製造されたポリエステルの N M R 分析チャートである。

【書類名】 図面

【図 1】

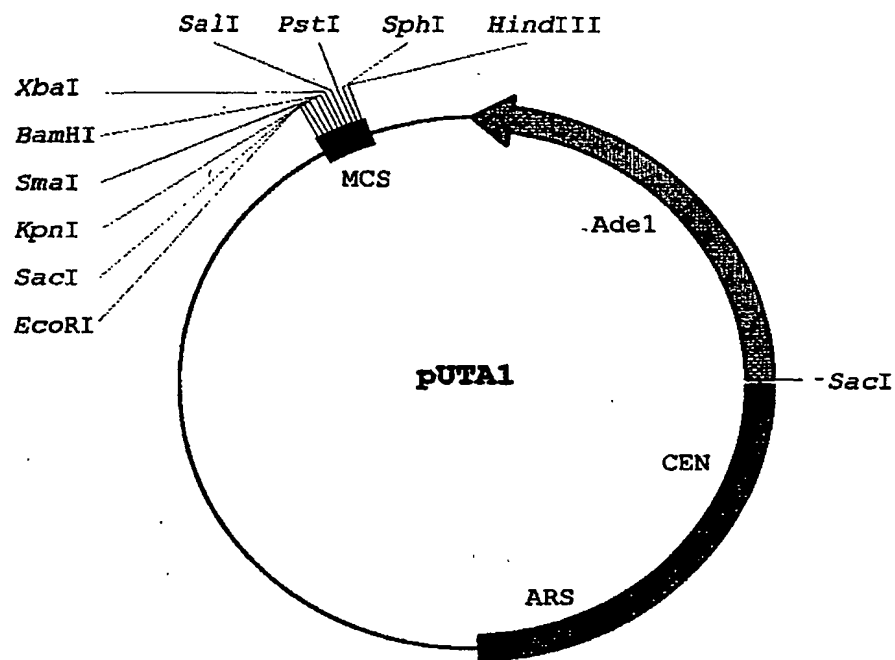


図1 pUTA1

【図2】

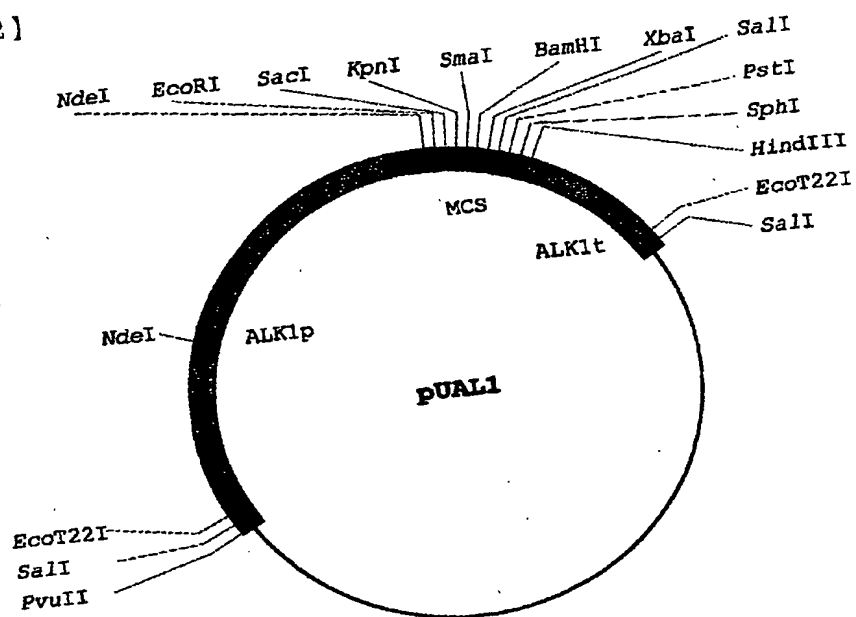


図2 pUAL1

【図 3】

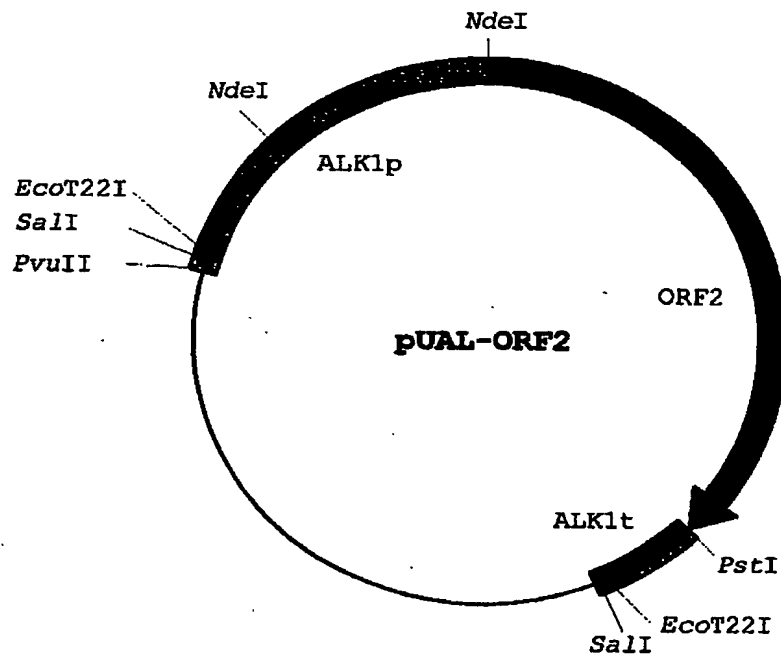


図 3 pUAL-ORF2

【図 4】

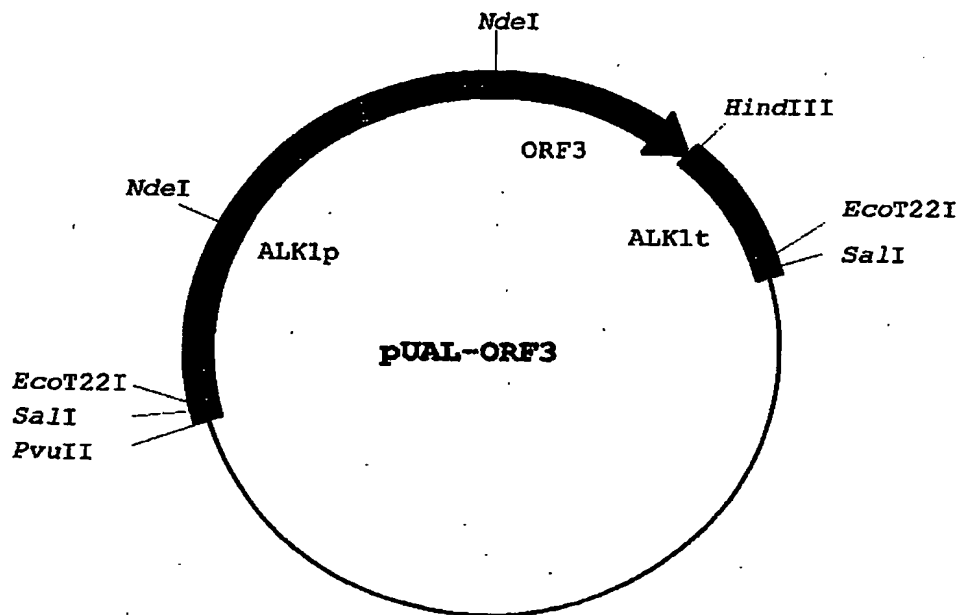


図 4 pUAL-ORF3

【図5】

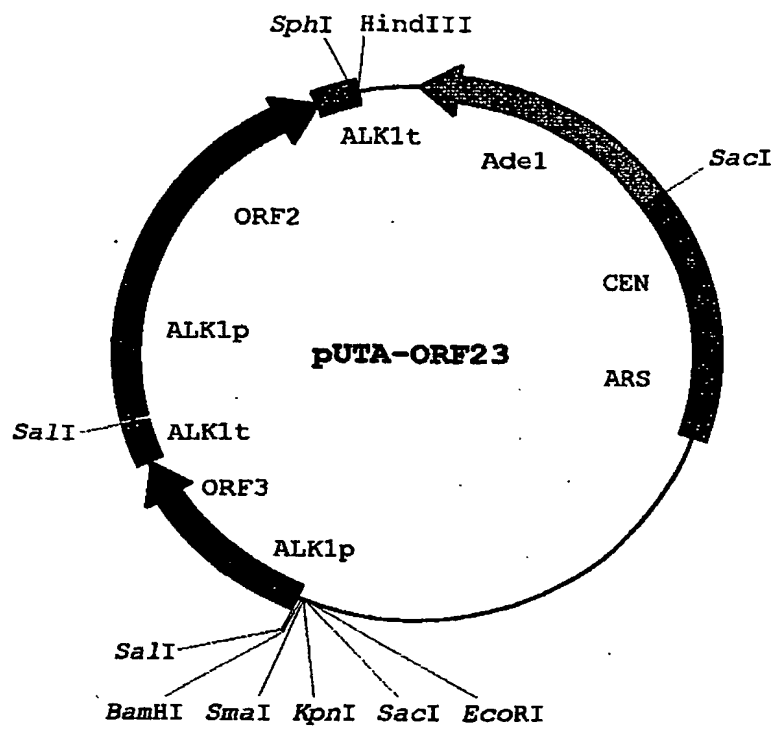


図5 pUTA-ORF23

【図 6】

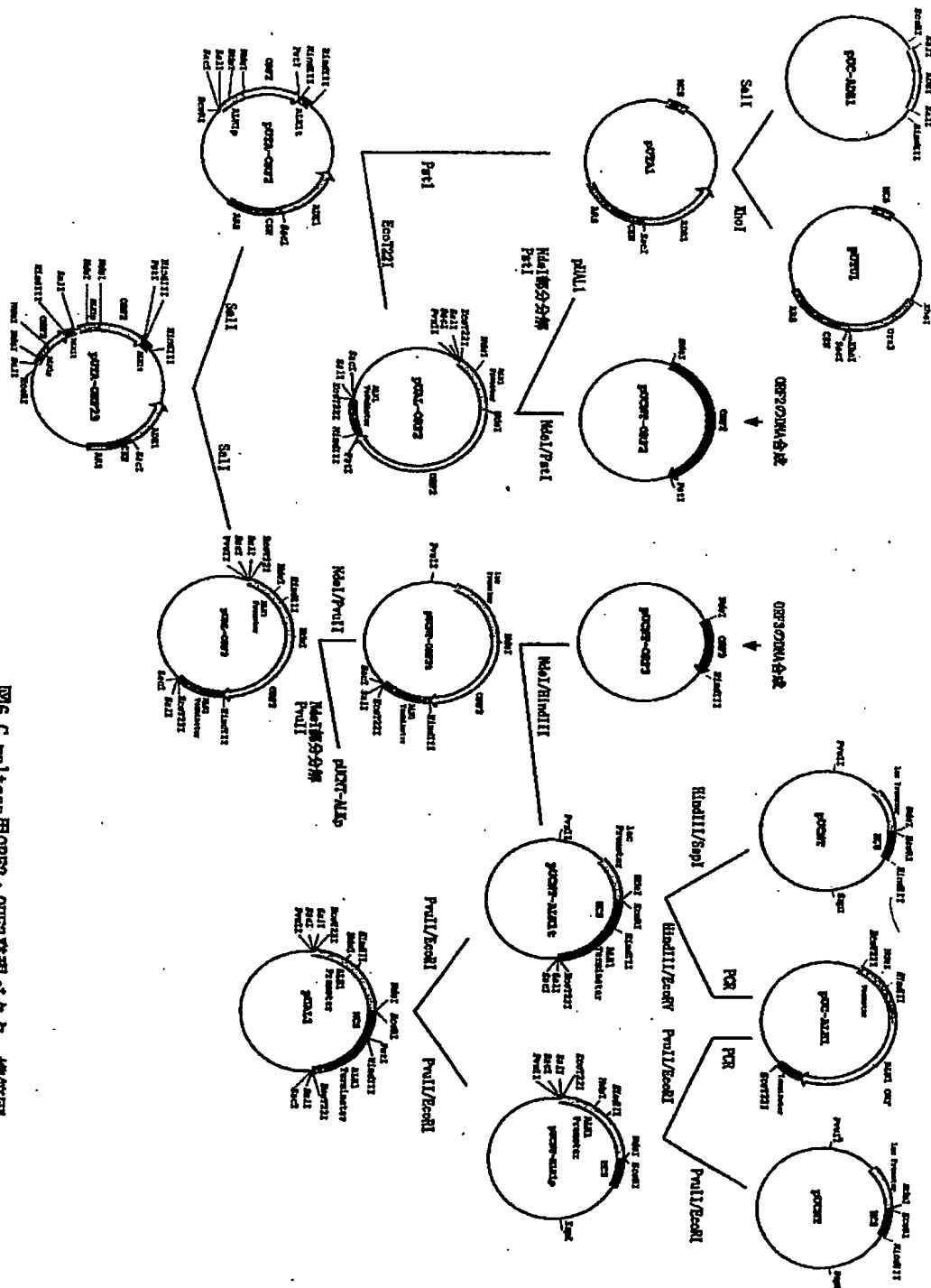


図6 C. maltosa用ORF2・ORF3発現ベクター構築図

【図 7】

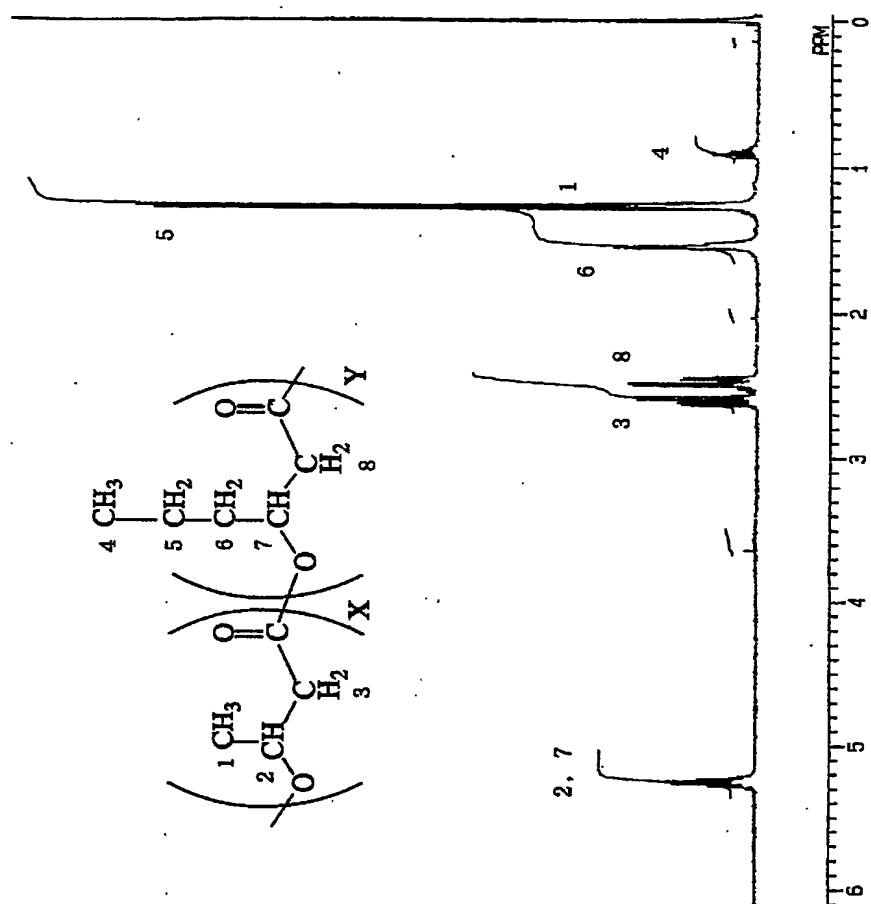


図 7 NMR 分析結果

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生分解性かつ優れた物性を有する一般式（１）で示される３－ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルの、高生産性が期待できる酵母を宿主とした製造方法の開発。

【解決手段】 ポリエステル合成に関与する１種以上の酵素遺伝子発現カセットを酵母に導入し、得られた形質転換株を培養することにより、一般式（１）で示される３－ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルを菌体内に蓄積させ、その培養物からポリマーを採取する。

【選択図】 なし

特2000-396955

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

氏 名 鐘淵化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.